

Séquençage de l'ADN

Définition

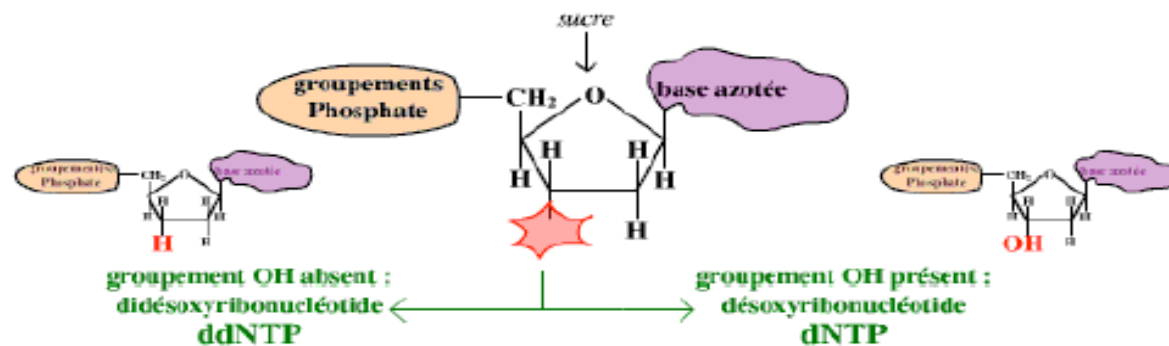
- Le séquençage de l'ADN, est la détermination de la
- succession des nucléotides le composant.
- C'est aujourd'hui une technique de routine pour les
- laboratoires de biologie.
- Cette technique utilise les connaissances qui ont été
- acquises depuis une trentaine d'années sur les
- mécanismes de la réplication de l'ADN

Le séquençage selon la technique de Sanger

Les ADN polymérase sont capables de synthétiser un brin complémentaire d'ADN, à partir d'un brin matrice.

Pour le séquençage des nucléotides légèrement différents sont utilisés: les didésoxyribonucléotides (**ddNTP**) au lieu des désoxyribonucléotides triphosphate (dNTP).

Les ddNTP diffèrent des dNTP par l'absence d'un groupement OH en position 3'. Ainsi lorsqu'une ADN polymérase utilise un ddNTP, elle n'est plus capable de rajouter le moindre nucléotide à sa suite : la synthèse du brin d'ADN s'arrête.

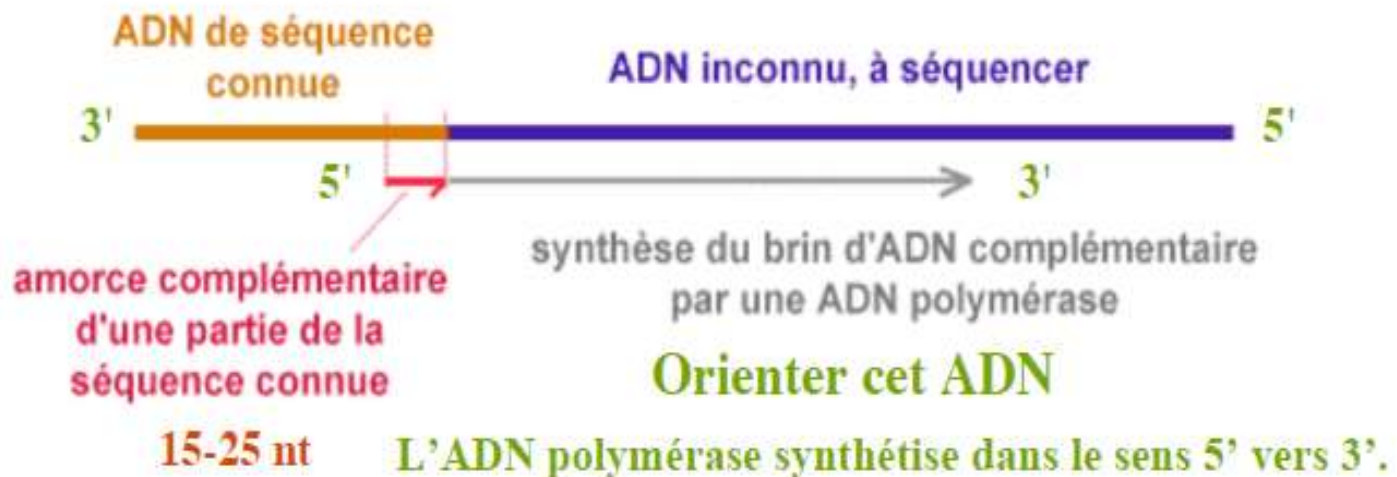


Deux types de nucléotides triphosphates

Le protocole

Il faut préparer 4 mélanges:

- le fragment qui doit être séquencé
- un petit morceau d'ADN dont la séquence est complémentaire à l'extrémité 3' du fragment à séquencer = **amorce**
- les 4 dNTP's (dCTP, dATP, dGTP, dTTP)
- l'ADN polymérase



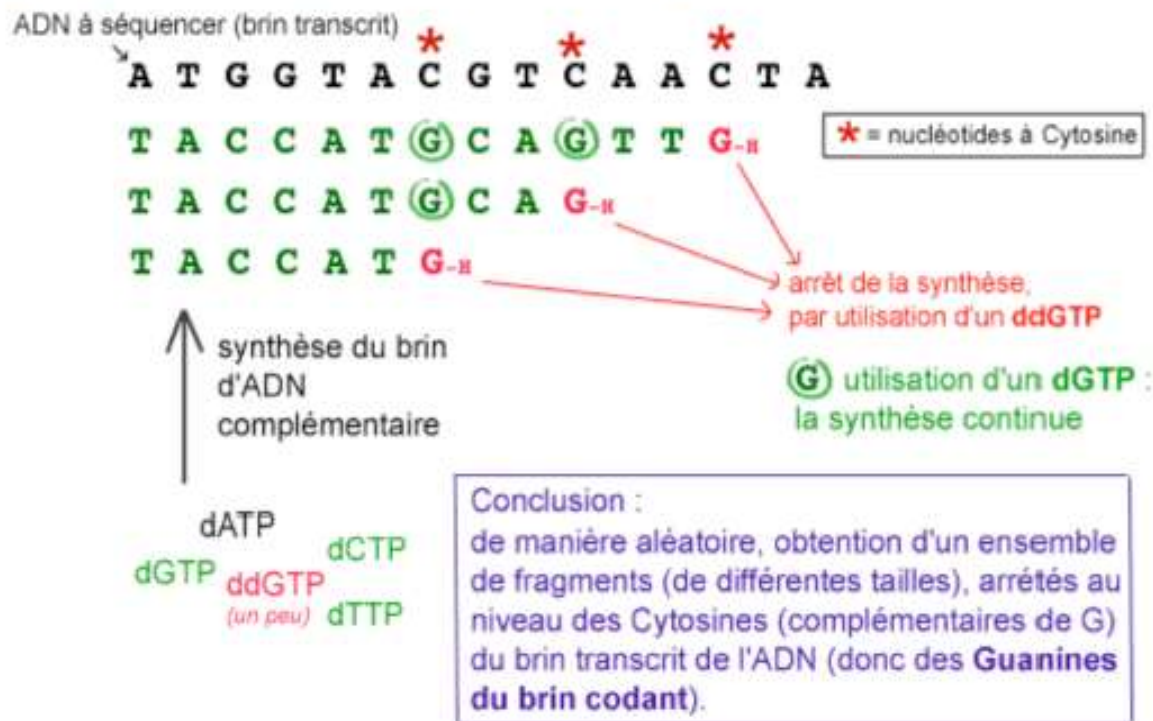
Le protocole

Il faut préparer 4 mélanges:

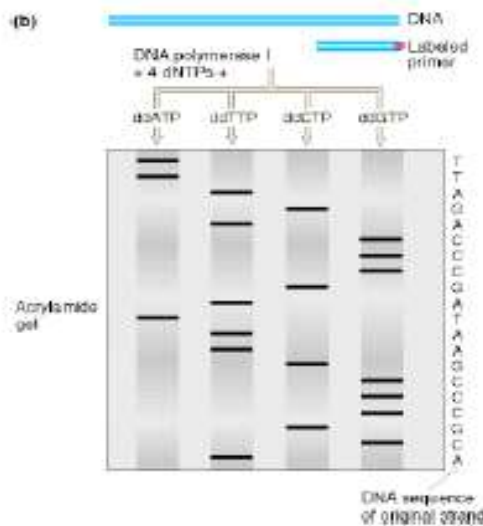
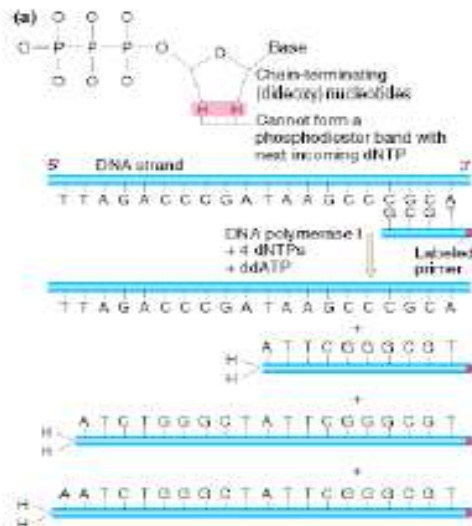
- le fragment qui doit être séquencé
 - un petit morceau d'ADN dont la séquence est complémentaire à l'extrémité 3' du fragment à séquencer
 - les 4 dNTP's (dCTP, dATP, dGTP, dTTP)
 - l'ADN polymérase
 - dans chaque tube, de petites quantités d'un ddNTP fluorescent ou radioactif
- > son incorporation aléatoire stoppant la synthèse
- On obtient à la fin des réactions un ensemble de brins d'ADN de tailles variées, selon l'endroit où un ddNTP se sera inséré et que la réaction aura ainsi été stoppée

L'utilisation d'un ddNTP permet d'obtenir un ensemble de fragments d'ADN de différentes tailles, correspondant aux emplacements d'un nucléotide donné

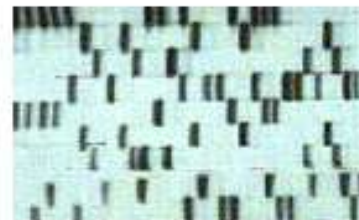
NB synthèse du brin complémentaire, donc si arrêt par un ddGTP, c'est qu'il y a une Cytosine sur la séquence



Lecture de la séquence -séquençage "à la main"-



- Électrophorèse sur gel d'acrylamide.
- Détection des fragments d'ADN, soit en regardant la fluorescence, soit en exposant un film photographique au gel selon le marquage du ddNTP
- Suivant la taille des gels la séquence lue est limitée de 200 à 750 nucléotides environ



L'automatisation du séquençage

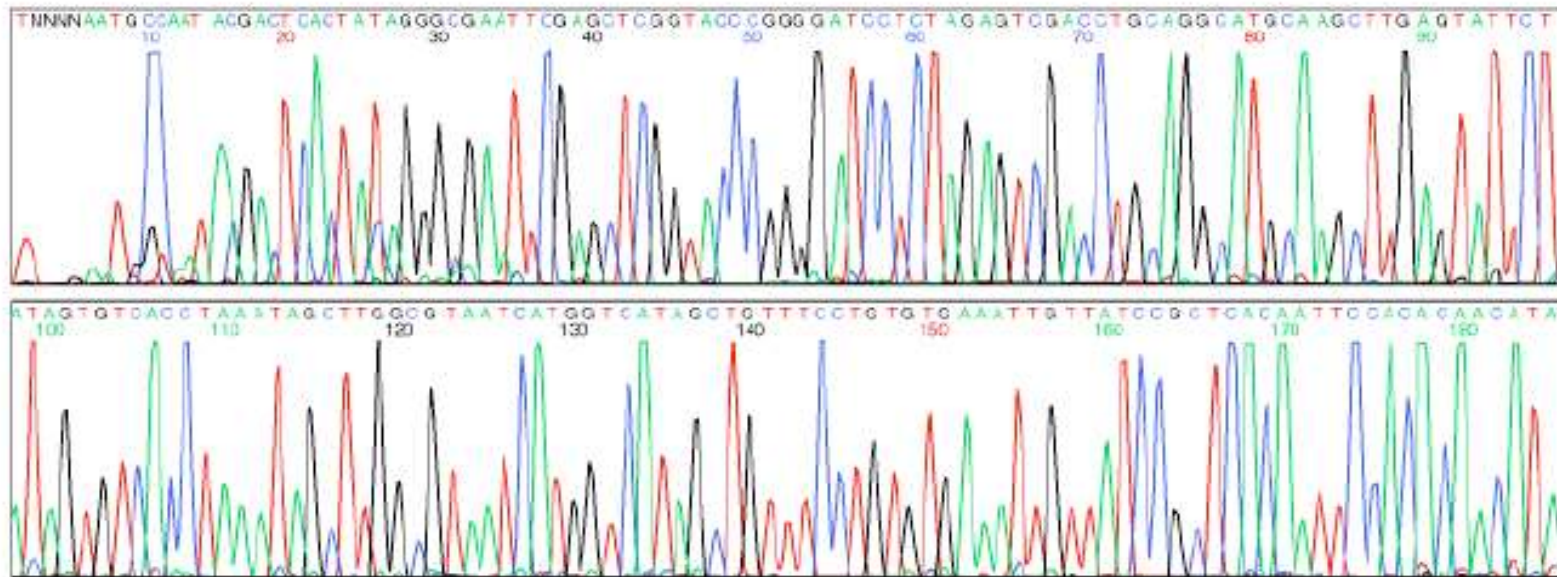


↑ Ajout des 4 ddNTP marqués par un fluorophore différent à la même réaction

Séquenceurs automatiques capables de réaliser les réactions de séquence, puis de les lire.

Une fois la réaction de séquence terminée, la taille des fragments obtenus est déterminée par une chromatographie. Le séquenceur détecte la fluorescence sortant des colonnes de chromatographie, repérant ainsi les fragments d'ADN et leur taille précise.

Exemple d'enregistrement obtenu à partir d'un séquenceur automatique



Les séquenceurs permettent de lire plusieurs centaines de nucléotides avec une très bonne qualité, jusqu'à 1000 pour les appareils les plus performants !

Sondes et hybridation

- **Hybridation d'acides nucléiques (AN) ou de protéines**

- **1. Notion de complémentarité: reconnaissance moléculaire**
complémentarité de séquence -AN- ou de structure -protéine-

- **2. Complexe sonde-cible (hybride)**

- ❖ ADN-ADN (sonde= complémentaire antiparallèle)
- ❖ ADN-ARN
- ❖ protéine-protéine (complexe Ac/Ag)

- **3. Hybridation - est spécifique (sonde /cible)**

A lieu même en présence d'un large excès de molécules similaires mais non identiques

--> **détection d'une molécule d'ADN ou d'ARN, ou de protéine dans un mélange en contenant des milliers de similaires "trouver une aiguille dans une meule de foin"**

Les sondes d'acides nucléiques

✗ fragment d'ADN ou ARN marqué

sonde radioactive (incorporation de nucléotides radioactifs)

sonde froide

✗ générée *in vitro* avec une séquence complémentaire de la séquence recherchée

fragment de restriction

produit PCR

synthèse "commerciale"

Les sondes radioactives -chaudes- (1)

✕ sondes mono ou double brins

✕ Phosphate³² (radio-isotope le + utilisé), Soufre³⁵, H³ (tritium)

✕ Incorporé dans la sonde enzymatiquement au moyen d'un ou plusieurs nucléotides triP radiomarqués

--> **marquage en 5'**: T4 polynucléotide kinase ajoute un P³² en 5' (sonde peu radioactive)

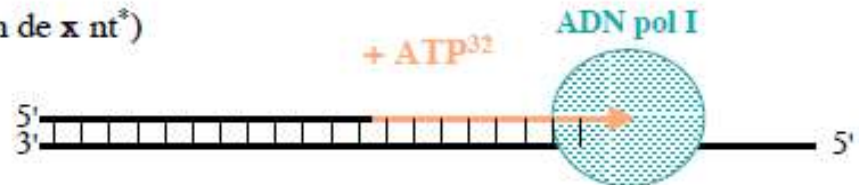
--> **marquage en 3'** :

*avec une ADN polymérase: ADN pol I ou T4, Taq pol(PCR)

(sondes très radioactives car incorporation de x nt*)

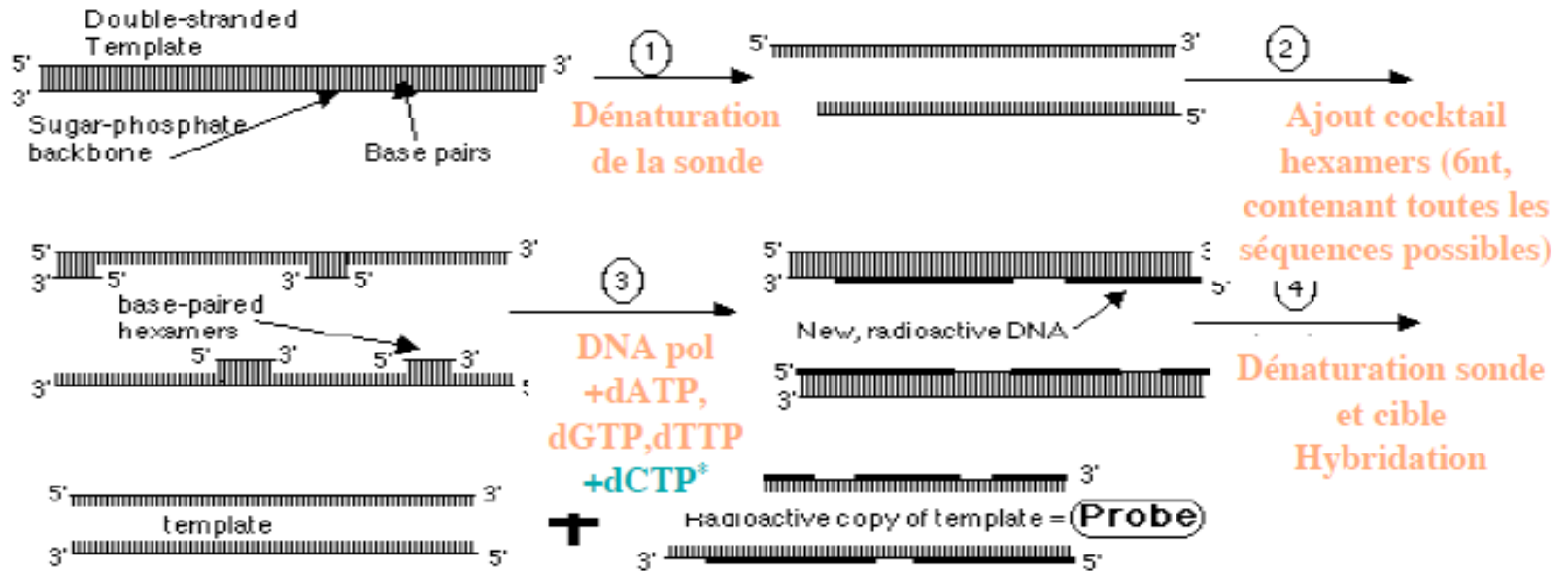
*avec une exonucléase

*avec une terminal transférase



Les sondes radioactives (2)

--> par amorçage au hasard (Random Priming)



--> marquage par "translation de coupure" (Nick Translation): DNaseI (conditions ménagées) pour générer quelques coupures simple brin dans le fragment d'intérêt, puis ADN pol.I pour dégrader l'ADN dans sens 5'-3' au niveau de ces coupures et repolymériser en présence d'un nt radioactif.

Les sondes radioactives (3)

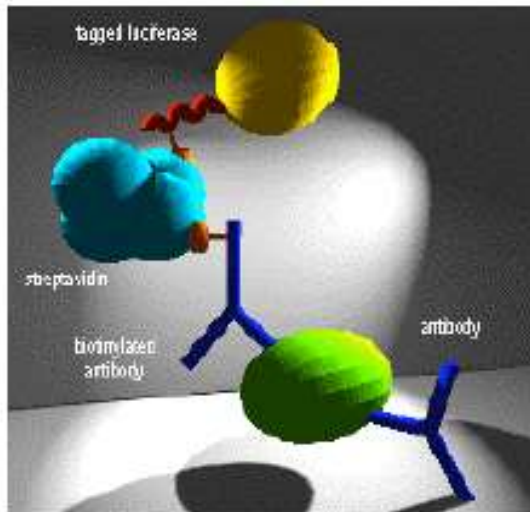
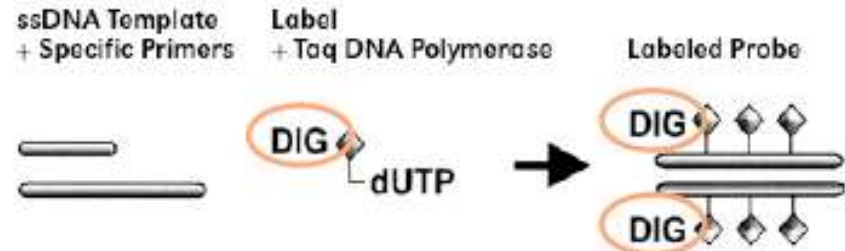
✕ sondes d'ARN (ribosondes) rendements d'hybridation meilleurs par rapport aux hybrides ADN-ADN, plus stables

Attention : les sondes radioactives présentent de nombreux inconvénients :

1. nécessité de se protéger contre le rayonnement émis, maniement des sondes inconfortable
2. décroissance rapide du P^{32} , d'où besoin de marquer les sondes fréquemment

Les sondes froides

✗ digoxigénine



✗ marquage par la biotine-streptavidine.

✗ fluorophore

Attention: problème de sensibilité --> leur utilisation ne fait pas toujours l'unanimité...

Principe de l'hybridation

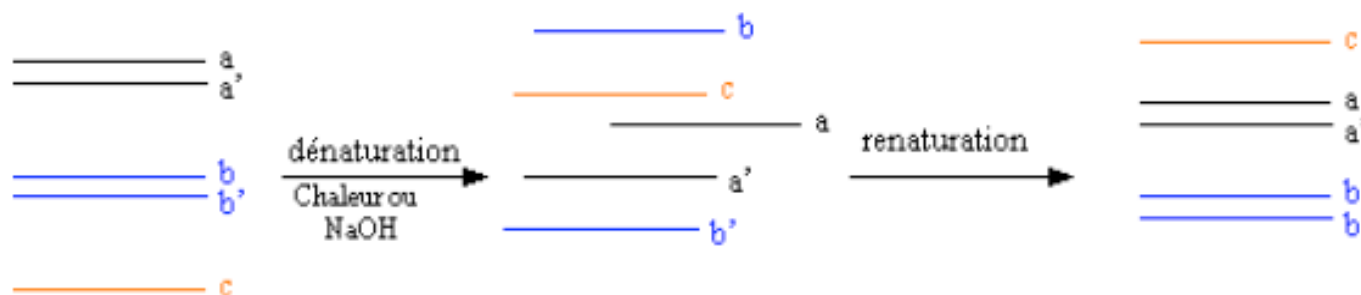
Hybridation peut avoir lieu

- en solution
- support solide : immobilisation sur membrane, sur verre, colonies bactériennes, chromosome, coupe de tissus...
- **Objectif** : détecter la présence d'un acide nucléique d'une séquence donnée par l'utilisation d'une sonde complémentaire

Dénaturation-renaturation ADN

Principe: Dénaturation (séparation des brins par rupture des liaisons hydrogènes: $t_{re} > T_m$ ou $pH > 12$) **d'ADN double brins de séquences différentes**

puis réassociation spécifique (conditions favorables de t_{re} et pH)
--> **hybridation des ADN simple brin pour former les homoduplex originels.**



(a, a'), (b, b') = séquences double brin complémentaires

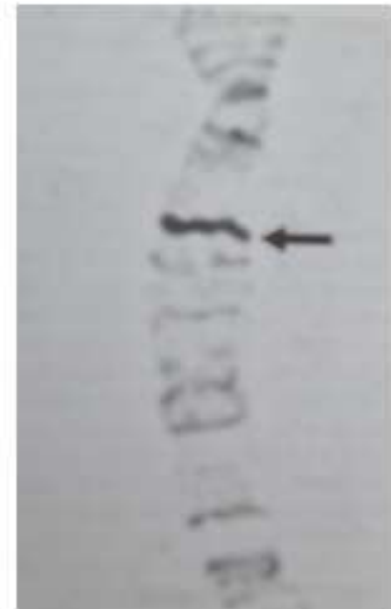
Hybridation *in situ* sur chromosome

X Objectif : déterminer sur quel chromosome et dans quelle région se trouve le gène dont on possède la sonde.

X En pratique:

- préparation des chromosomes
- hybridation directement sur les préparations fixées sur lame
- Sonde marquée au tritium (H^3): rayonnement très court, donne donc une localisation fine de la zone émettant la radioactivité.
- résultat lu sous microscope : les signaux positifs apparaissent sous forme de grains noirs disposés sur les chromosomes.

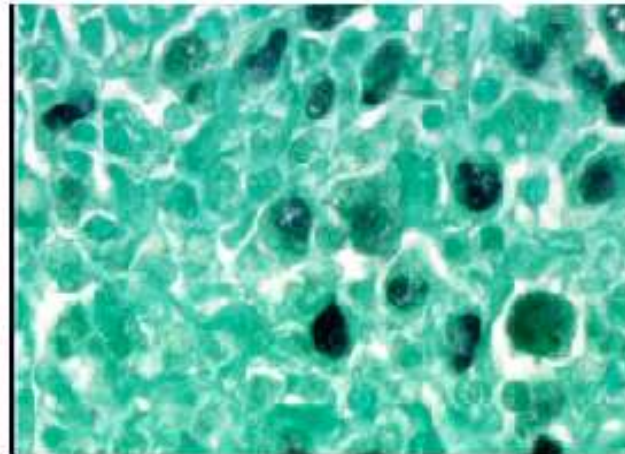
**Détection d'un
gène de Drosophile**



Hybridation *in situ*

✕ **Détection du virus d'Epstein-Barr** à l'aide d'une sonde reconnaissant l'ARN (= génome) du virus

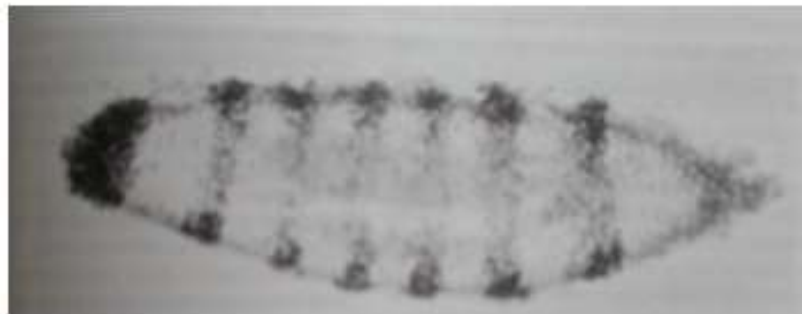
- coloration nucléaire bleu foncée des noyaux infectés
- contre coloration verte des autres noyaux



Indications: Syndromes lymphoprolifératifs et lymphomes

Hybridation sur coupe de tissu

⌘ Objectif : déterminer quelle sous population du tissu exprime un ARN donné (un tissu est généralement constitué de différents types cellulaires, pas toujours faciles à séparer)



Coupe d'embryon de *Drosophile* qui a subi une hybridation avec une sonde d'un gène impliqué dans le développement embryonnaire

Hybridation sur colonie de bactéries, sur plage de lyse

✗ **Objectif:** détecter parmi un grand nombre de bactéries ou de phages recombinants celle ou celui qui contient le fragment d'ADN recherché

--> **criblage de banque**

**Boîtes avec colonies
-bactéries ou phages-
(milliers à millions)**

**Coussin de NaOH
(éclatement cellules +
dénaturation ADN)**

Hybridation

Lavages

+ Sonde



**Prise
d'empreinte
(nylon ou
nitrocellulose)**

**Fixation
(cuisson ou UV)**

**Autoradiographie
Localisation des
clones d'intérêt**

Bon courage